

## PRESERVASI DAN KRIOPRESERVASI SEMEN SAPI LIMOUSIN DALAM BERBAGAI BAHAN PENGECER

### *Preservation and Cryopreservation of Limousin Semen in Various Extender*

Sri Suharyati dan Madi Hartono

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Lampung, Lampung

E-mail: madihartono66@yahoo.co.id

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui jenis bahan pengencer yang paling baik untuk mempertahankan kualitas sperma sapi Limousin selama penyimpanan dan pembekuan. Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 penggunaan bahan pengencer yaitu  $P_1$ =Andromed<sup>®</sup>;  $P_2$ =tris-kuning telur;  $P_3$ =susu skim, dan 4 kelompok waktu koleksi sebagai ulangan. Hasil penelitian menunjukkan pengencer Andromed<sup>®</sup> memberikan pengaruh terbaik terhadap kualitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa dengan pengencer Andromed<sup>®</sup> selama penyimpanan 18 jam, setelah ekuilibrisasi, dan setelah *thawing* masing-masing adalah 61,45; 73,13; dan 48,13%. Persentase spermatozoa hidup dengan pengencer Andromed<sup>®</sup> selama penyimpanan 18 jam, setelah ekuilibrisasi, dan setelah *thawing* masing-masing adalah 83,25; 81,88; dan 55,53%. Persentase spermatozoa abnormal dengan pengencer Andromed<sup>®</sup> selama penyimpanan 18 jam, setelah ekuilibrisasi, dan setelah *thawing* masing-masing adalah 4,60; 10,73; dan 11,70%.

Kata kunci: kualitas sperma, sapi Limousin, preservasi, kriopreservasi

#### ABSTRACT

*This research aimed to verify the best extender which able to preserve quality of Limousin semen during preservation and cryopreservation. A Completely Randomized Block design with four replication was used with three extenders those were  $P_1$ = Andromed<sup>®</sup>;  $P_2$ =stock solution;  $P_3$ =skim milk. The result of this study showed that the Andromed extender provide the best influence on spermatozoa quality. The percentage of spermatozoa motility after 18 hrs storage time, equilibration, and thawing are 61.45, 73.13, dan 48.13%, respectively. In respectively, the life cells percentage are 83.25, 81.88, 55.53% after 18 hours storage time, equilibration, and thawing, whereas the percentage of spermatozoa abnormality are 4.60%, 10.73 %, and 11.70 % after 18 hours storage time, equilibration, and thawing.*

Keywords: sperma quality, Limousin, preservation, cryopreservation

#### PENDAHULUAN

Salah satu usaha untuk meningkatkan kualitas sapi lokal adalah dengan cara teknologi inseminasi buatan (IB) menggunakan sapi yang mempunyai kualitas genetik yang unggul, diantaranya sapi Limousin. Sapi Limousin termasuk ternak potong berkualitas baik, bentuk tubuhnya panjang, dan tingkat pertumbuhannya tinggi (Pane, 1993).

Program IB akan berhasil dengan baik apabila sperma diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang baik (Toelihere, 1993). Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk menyediakan sumber energi bagi sperma sehingga menjamin kelangsungan hidup sperma selama penyimpanan (preservasi) atau pembekuan (kriopreservasi). Syarat penting bahan pengencer sperma adalah mampu menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi, mencegah terjadinya *cold shock* sewaktu

preservasi dan kriopreservasi, menjaga pH dan tekanan osmotik yang sama dengan sperma (Salisbury dan Van demark, 1985).

Beberapa bahan pengencer telah banyak digunakan untuk meningkatkan daya hidup spermatozoa. Andromed<sup>®</sup> merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar tris yang paling populer digunakan untuk pengencer semen beku sapi. Andromed<sup>®</sup> merupakan bahan pengencer komersial terdiri dari fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminometan, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin tartrat, gentamisin sulfat, spektinomisin, dan linkomisin (Minitub, 2001). Pengencer berbahan dasar tris diketahui kemampuannya dalam memelihara daya hidup spermatozoa sapi (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 2000). Secara umum, ke dalam bahan pengencer biasanya ditambahkan kuning telur yang berfungsi melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) selama penyimpanan (Tsutsui *et al.*, 2003).

**MATERI DAN METODE**

Dalam penelitian ini digunakan semen sapi yang dikoleksi dari satu ekor pejantan sapi Limousin berumur ±4 tahun dan satu betina dewasa sebagai pemancing. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 penggunaan bahan pengencer yaitu P<sub>1</sub>= Andromed<sup>®</sup>; P<sub>2</sub>= Tris-kuning telur; P<sub>3</sub>= susu skim dan 4 kelompok waktu koleksi. Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf 5 dan atau 1% serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk perlakuan yang berbeda nyata terhadap variabel atau peubah yang diukur.

Penelitian ini dilaksanakan dengan dua bagian, yaitu preservasi dan kriopreservasi semen sapi Limousin dalam berbagai bahan pengencer. Pembuatan bahan pengencer dilakukan sebelum pelaksanaan penampungan semen. Pengencer Andromed<sup>®</sup> yang telah tersedia disiapkan dan dicampur dengan aquabides dengan perbandingan 1:4. Pembuatan pengencer tris-kuning telur dengan menimbang 3,87 g tris aminometan; 2,17 g asam sitrat; 1,56 g fruktosa, selanjutnya dicampur dan dilarutkan menggunakan aquabides sampai volumenya 100 ml, selanjutnya ditambahkan 20 ml kuning telur, kemudian ditambahkan 0,3 penisilin, 100 mg streptomisin, dan 6,5 ml gliserol dan diaduk sampai homogen. Pembuatan pengencer susu skim dilakukan dengan dengan menimbang 10 g

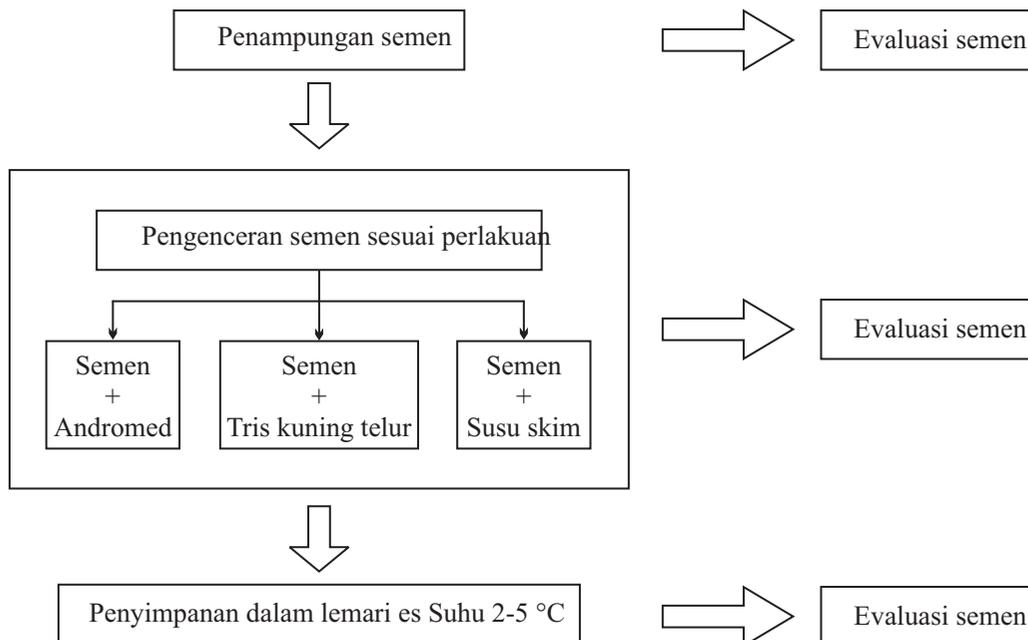
susu skim kemudian dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer lalu dilarutkan dengan aquabides sebanyak 100 ml, setelah dihomogenkan selanjutnya dipanaskan secara tidak langsung pada pemanas air sampai suhu mencapai 92-95 °C selanjutnya didinginkan dan disaring. Sebelum digunakan terlebih dahulu ditambahkan gliserol sebanyak 7%, 0,001 g streptomisin, dan 0,001 g penisilin.

**Preservasi Semen Sapi Limousin**

Penampungan semen dilakukan dengan metode vagina buatan (Toelihere, 1993). Volume semen yang didapat dibagi menjadi tiga bagian, selanjutnya diencerkan menggunakan bahan pengencer yang telah disiapkan dengan perbandingan 1:10 (1 bagian semen dan 10 bagian pengencer) kemudian dimasukkan dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam lemari es dengan suhu 2-5 °C. Pengamatan dilakukan setiap 3 jam selama 18 jam. Prosedur kerja preservasi dan evaluasi semen sapi Limousin disajikan pada Gambar 1.

**Kriopreservasi Semen Sapi Limousin**

Penampungan semen dilakukan dengan metode vagina buatan (Toelihere, 1993). Volume semen yang didapat dibagi menjadi tiga bagian, selanjutnya diencerkan menggunakan bahan pengencer dengan perbandingan 1: 10, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam lemari es dengan suhu 2-5 °C



**Gambar 1.** Prosedur kerja preservasi dan evaluasi semen sapi Limousin

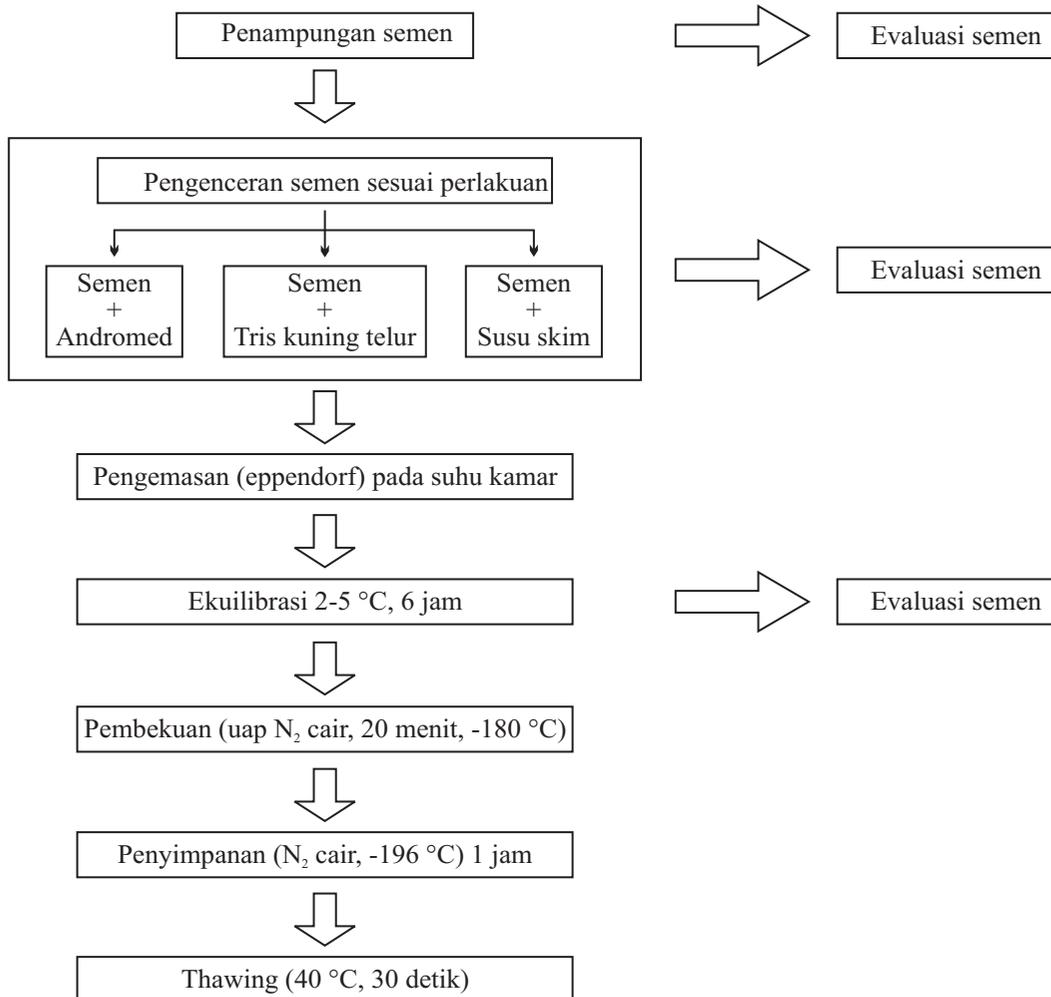
selama 6 jam untuk ekuilibrasi (Tejawati, 1997). Setelah ekuilibrasi, tabung eppendorf dimasukkan ke dalam kontainer nitrogen cair untuk dibekukan. Pembekuan terdiri atas empat tahapan (masing-masing 5 menit) yaitu berada dalam uap nitrogen cair pada leher kontainer, sedikit di bawah leher kontainer (temperatur -180 °C), pada pertengahan kontainer (temperatur -188 °C) dan selanjutnya diturunkan sampai dasar kontainer (temperatur -196 °C). Setelah pembekuan selama 1 jam selanjutnya dilakukan *thawing* (pencairan kembali) dengan cara mencelupkan tabung eppendorf ke dalam air yang bersuhu 40 °C selama 30 detik dan dievaluasi (Wagelie *et al.*, 1982). Prosedur kerja kriopreservasi dan evaluasi semen sapi Limousin disajikan pada Gambar 2.

Peubah yang diukur untuk mengetahui kualitas sperma selama preservasi dan kriopreservasi adalah motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa abnormal.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Pengencer terhadap Motilitas dan Spermatozoa Hidup

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa ketiga bahan pengencer berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap motilitas dan persentase hidup spermatozoa setelah penyimpanan, ekuilibrasi, dan *thawing*. Pada preservasi selama 18 jam, uji BNT menunjukkan Andromed<sup>®</sup> berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) dengan tris-kuning telur dan pengencer susu skim, serta tris-kuning telur berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap pengencer susu skim (Tabel 1 dan 2). Pada kriopreservasi, pengencer Andromed<sup>®</sup> dengan tris-kuning telur tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap motilitas (Tabel 1) dan persentase hidup spermatozoa (Tabel 2) setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing*, namun keduanya berbeda nyata dengan pengencer susu skim.



**Gambar 2.** Prosedur kerja kriopreservasi dan evaluasi semen cair sapi Limousin

Andromed<sup>®</sup> adalah pengencer yang siap pakai, yang disusun dari zat-zat yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama pengolahan, penyimpanan pada suhu rendah, dan selama proses kriopreservasi. Menurut Minitub (2001), komposisi kimia bahan pengencer Andromed<sup>®</sup> tersusun dari beberapa bahan yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama proses pembekuan, diantaranya natrium dan kalium yang berperan dalam menjaga integritas fungsional membran plasma spermatozoa. Kalium juga berperan dalam menginduksi motilitas dan hiperaktivasi spermatozoa, serta dapat memengaruhi daya tahan hidup spermatozoa.

Pada pengencer tris-kuning telur terdapat kuning telur yang juga mengandung bahan-bahan yang diperlukan sperma (Sorensen, 1979). Kuning telur berperan sebagai sumber energi dan agen protektif yang

mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi dan mempertahankan integritas selubung protein pada membran sel dari sperma untuk mencegah *cold shock* (Salisbury dan Van demark, 1985). Fruktosa berfungsi sebagai sumber energi yang siap digunakan dalam metabolisme dan mempertahankan tekanan osmotik dalam pelarut. Penambahan gliserol ke dalam pengencer esensial untuk pembekuan dan untuk semen yang tidak dibekukan dapat meningkatkan daya tahan spermatozoa (Toelihere, 1993).

Rendahnya persentase spermatozoa hidup pada pengencer susu skim kemungkinan disebabkan kandungan laktosa tinggi yang dapat mempercepat metabolisme spermatozoa selanjutnya terjadi penumpukan asam laktat yang akan menjadi racun bagi spermatozoa akibatnya banyak spermatozoa mati. Susu skim yang dipakai mempunyai kandungan

**Tabel 1.** Motilitas spermatozoa semen sapi Limousin pada beberapa bahan pengencer

Pengamatan (%)	Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
		K1	K2	K3	K4		
Setelah penyimpanan 18 jam	P1	55,00	65,00	60,00	65,00	245,00	61,45 <sup>a</sup>
	P2	40,00	40,00	50,00	50,00	180,00	45,00 <sup>b</sup>
	P3	5,00	5,00	5,00	5,00	20,00	5,00 <sup>c</sup>
Setelah ekuilibrase	P1	70,00	77,50	70,00	75,00	292,50	73,13 <sup>a</sup>
	P2	57,50	75,00	65,00	75,00	272,50	68,13 <sup>a</sup>
	P3	30,00	57,50	57,50	52,50	197,50	49,38 <sup>b</sup>
Setelah thawing	P1	27,50	62,50	50,00	52,50	192,50	48,13 <sup>a</sup>
	P2	20,00	52,50	42,50	50,00	165,00	41,25 <sup>a</sup>
	P3	12,50	22,50	17,50	20,00	72,50	18,13 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05) (P1 = Andromed<sup>®</sup>, P2 = tris-kuning telur, dan P3 = susu skim)

**Tabel 2.** Persentase spermatozoa hidup

Pengamatan (%)	Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
		K1	K2	K3	K4		
Spermatozoa hidup setelah 18 jam disimpan	P1	84,00	85,00	83,00	81,00	333,00	83,25 <sup>a</sup>
	P2	80,00	81,00	77,00	78,00	316,00	79,00 <sup>b</sup>
	P3	76,00	76,00	70,00	75,00	297,00	74,25 <sup>c</sup>
Spermatozoa hidup setelah ekuilibrase	P1	79,10	89,10	78,40	80,90	327,50	81,88 <sup>a</sup>
	P2	74,50	83,60	74,50	76,20	308,80	77,20 <sup>a</sup>
	P3	64,70	67,30	69,70	58,90	260,60	65,15 <sup>b</sup>
Spermatozoa hidup setelah thawing	P1	30,00	69,40	59,80	62,90	222,10	55,53 <sup>a</sup>
	P2	23,90	57,00	50,00	54,60	185,50	46,38 <sup>a</sup>
	P3	18,60	35,10	27,20	28,20	109,10	27,28 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05) (P1 = Andromed<sup>®</sup>, P2 = tris-kuning telur, dan P3 = susu skim)

**Tabel 3.** Persentase abnormalitas spermatozoa

Pengamatan (%)	Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
		K1	K2	K3	K4		
Spermatozoa abnormal setelah 18 jam penyimpanan	P1	3,90	3,50	6,20	4,80	18,40	4,60 <sup>a</sup>
	P2	3,80	5,20	6,70	6,00	21,70	5,43 <sup>a</sup>
	P3	4,30	4,20	5,50	4,00	18,00	4,50 <sup>a</sup>
Spermatozoa abnormal setelah ekuilibrasi	P1	12,60	7,10	8,70	14,50	42,90	10,73 <sup>b</sup>
	P2	16,50	11,30	11,40	12,00	51,20	12,80 <sup>b</sup>
	P3	20,40	22,80	18,30	20,00	81,50	20,38 <sup>a</sup>
Spermatozoa abnormal setelah <i>thawing</i>	P1	18,00	9,40	7,80	11,60	46,80	11,70 <sup>b</sup>
	P2	20,80	16,90	16,30	17,60	71,60	17,90 <sup>a</sup>
	P3	23,20	20,80	17,50	19,80	81,30	20,33 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) (P1 = Andromed<sup>®</sup>, P2 = tris-kuning telur, dan P3 = susu skim)

lemak tinggi yaitu 22%, ini menjadikan gerakan spermatozoa terhambat. Salisbury dan Van demark (1985) mengemukakan bahwa kecepatan gerak spermatozoa dipengaruhi oleh konsentrasi spermatozoa, umur spermatozoa, dan tingkat viskositas media pengencer. Pengencer susu skim memiliki tingkat viskositas tinggi karena kandungan lemak yang tinggi, sehingga persentase motilitas yang dihasilkan pada pengencer susu skim lebih rendah.

#### Pengaruh Pengencer terhadap Persentase Spermatozoa Abnormal

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa ketiga bahan pengencer berpengaruh tidak nyata ( $P > 0,05$ ) selama preservasi namun berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa selama kriopreservasi. Uji BNT menunjukkan Andromed<sup>®</sup> dengan tris-kuning telur tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap persentase spermatozoa abnormal setelah ekuilibrasi, namun keduanya berbeda nyata dengan pengencer susu skim (Tabel 3), serta Andromed<sup>®</sup> berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan tris-kuning telur dan pengencer susu skim terhadap persentase spermatozoa abnormal setelah *thawing* (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa pengencer Andromed<sup>®</sup> lebih mampu menjaga spermatozoa dari kerusakan akibat suhu rendah. Situmorang (2002) menyatakan bahwa bahan dalam kuning telur yang berupa lesitin dan lipoprotein berfungsi untuk melindungi spermatozoa pada saat pengenceran, pendinginan, dan pembekuan.

#### KESIMPULAN

Pengencer Andromed<sup>®</sup> memberikan pengaruh terbaik terhadap kualitas spermatozoa sapi Limousin dibanding tris-kuning telur dan susu skim.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Minitub. 2001. **Certificate Andromed**. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- Pane, I. 1993. **Pemuliabiakan Ternak Sapi**. Gramedia. Jakarta.
- Salisbury, G.W., and N.L. Van demark. 1985. **Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi**. R. Januar (Penerjemah). Gadjah Mada University Press Yogyakarta.
- Situmorang, P. 2002. The effect of inclusion of exogenous phospholipid in tris diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. **JITV**.7(3): 181-187.
- Sorensen, M. 1979. **Animal Reproduction**. McGraw-Hill Book Company, New Jersey.
- Tejowati, M.R. 1997. Pengaruh Pengencer Kuning Telur-Sitrat Glukosa dan Susu Sapi Segar Serta di Waktu Ekuilibrasi 2 dan 6 Jam terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Sebelum dan Sesudah Pembekuan. **Skripsi**. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Toelihere, M.R. 1993. **Inseminasi Buatan pada Ternak**. Angkasa Bandung.

- Tsutsui T., T. Tezuka, Y. Mikasa, H. Sugisawa, N. Kirihara, T. Hori, and E. Kawakami. 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. **J. Vet. Med. Sci.** 65(3): 307-312.
- van Wagendonk-de Leeuw A.M., R.M. Haring, L.M.T.E. Kaal-Lansbergen, and J.H.G. den Daas. 2000. Fertility results using bovine cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology.** 54(1): 57-67.
- Wagelie, E.B, V.B. Patricia, and R.T. Rojas. 1982. Prosesing technique and storing at Murrah buffalo semen in plastic straw. **Nat. Res. Count of The Pill. Reach Bull:** 37(1):153-164.